



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 197 50 702 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 H 21/04**  
A 61 K 31/70  
A 61 K 48/00  
C 12 N 15/11

②① Aktenzeichen: 197 50 702.6  
②② Anmeldetag: 15. 11. 97  
④③ Offenlegungstag: 27. 5. 99

**DE 197 50 702 A 1**

⑦① Anmelder:  
Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, 65929  
Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:  
Peyman, Anuschirwan, Dr., 65779 Kelkheim, DE;  
Uhlmann, Eugen, Dr., 61479 Glashütten, DE;  
Weiser, Caroline, Dr., 65795 Hattersheim, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
WO 94 21 664 A1  
J.Biol.Chem. 271 (1996) 8157-8160;  
J.Biomed.Mat.Res. 35 (1997) 525-530;  
Cancer Res. 56 (1996) 182-189;  
Mol.Biol. of the Cell 8 (1997) 2055-2075;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Antisense Oligonucleotide gegen Tenascin zur Behandlung von Vitiligo

⑤⑦ Die Erfindung betrifft spezifische, gegebenenfalls modifizierte Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 18 Nukleotiden, die Abschnitten Tenascin-kodierender Sequenzen entsprechenden bzw. die an diese Sequenzen binden können, deren Herstellung sowie die Verwendung derselben, beispielsweise zur spezifischen Inhibition der Expression von Tenascin und zur Herstellung von Arzneimitteln, die zur Behandlung von Vitiligo verwendet werden können.

**DE 197 50 702 A 1**

Die Erfindung betrifft spezifische, gegebenenfalls modifizierte Oligonukleotide mit einer Länge von bis zu 18 Nukleotiden, die Abschnitten Tenascin-kodierender Sequenzen entsprechenden bzw. die an diese Sequenzen binden können, deren Herstellung sowie die Verwendung derselben, beispielsweise zur spezifischen Inhibition der Expression von Tenascin und zur Herstellung von Arzneimitteln, die zur Behandlung von Vitiligo verwendet werden können.

Unter Vitiligo wird ein erworbenes Fehlen von Melanozyten verstanden, wodurch hypopigmentierte Hautbereiche entstehen, die in der Regel scharf begrenzt und häufig symmetrisch angeordnet sind, einen oder zwei Flecke bilden oder fast die ganze Haut erfassen. Das Haar in hypopigmentierten Bezirken ist normalerweise weiß und erscheint auch im Wood-Licht weiß. Die betroffenen Hautstellen sind anfällig gegen Sonnenbrand. Die Ursache der Erkrankung ist unbekannt. Obwohl die Vitiligo als eine im Laufe des Lebens erworbene Krankheit gilt, findet sich gelegentlich eine familiäre Häufung (autosomal-dominant, mit inkompletter Penetranz und variabler Ausprägung). Sie kann auch einem ungewöhnlichen physischen Trauma, insbesondere einer Schädelverletzung, folgen. Die Assoziation von Vitiligo mit einem Morbus Addison, Diabetes mellitus, perniziöser Anämie oder Schilddrüsendysfunktion wie auch das gehäufte Vorkommen von Antikörpern gegen Thyreoglobulin, Zellen der Nebenniere und Belegzellen des Magens im Serum haben dazu geführt, eine immunologische oder neurochemische Ursache zu vermuten. Antikörper gegen Melanin wurden bei einigen Patienten gefunden.

Alle verfügbaren Therapiemethoden führen nur bei einem Teil der Patienten zu befriedigenden Therapieerfolgen (F. Wach et al., H+G 71(1996) 206). Zu den vorhandenen Therapien (S. P. W. Kumarasinghe, Ceylon Medical Journal 40 (1995) 94) gehören Photochemotherapien (PUVA), beispielsweise mit Methoxypsoralen, Phenylalanin, oder Khellin, die Transplantation von kultivierten Melanocyten, "epidermal grafting", und die Behandlung mit Steroiden oder Plazenta-Extrakten. Kürzlich wurde über die Behandlung mit Pseudocatalase berichtet (Schallreuter et al., Dermatology 190 (1995) 223). Kleine Herde können auch mit kosmetischer Schminke oder Gerblösungen abgedeckt werden.

Poole et al. (British Journal of Dermatol. 137 (1997) 171) konnten zeigen, daß die Vitiligo befallene Haut im Vergleich zu normaler Haut einen hohen Gehalt an Tenascin aufweist. Der hohe Tenascin-Gehalt kann zum Verlust der Pigmentierung beitragen und die Repigmentierung verhindern. Tenascin (Crossin, J. Cell. Biol. 61 (1996) 592) ist ein extracelluläres Matrix Glykoprotein, das aus sechs identischen Untereinheiten besteht, welche am Amino-Terminus über Disulfid-Brücken verknüpft sind. Die Tenascin Untereinheiten weisen eine charakteristische Domänenstruktur auf: Auf eine Cystein-reiche Sequenz am aminoterminalen Ende folgen drei, jeweils aus sich wiederholenden Einheiten aufgebaute Sequenzabschnitte aus zum EGF homologen Einheiten, aus zum Fibronektin (Typ III) homologen Einheiten und aus zum Fibrinogen homologen Einheiten.

Es existieren mehrere Isoformen der Tenascin Untereinheiten (im folgenden als Tenascin Isoformen bezeichnet), die sich in der Anzahl der sich wiederholenden Einheiten, die zum Fibronektin Typ III homolog sind, unterscheiden. Diese Isoformen werden durch alternatives splicing der Tenascin pre-mRNA und anschließende Translation der verschiedenen Splicevarianten gebildet (A. Leprini et al., Perspectives on Developmental Neurobiology 2 (1994) 117-123). Eine cDNA von humanem Tenascin wurde von A. Siri et al. (Nucl. Acids Res. 19 (1991) 525-531) beschrieben (Sequenz in Tabelle 1). Diese cDNA ist unter der Zugangsnummer X56160 in Gen-Datenbanken gespeichert und kann unter dieser Nummer beispielsweise unter EMBL/Genbank/DDBJ/NBRF-PIR erhalten werden. Diese cDNA enthält einen Sequenzabschnitt, der für 12 sich wiederholende Einheiten, die zum Fibrinogen Typ III homolog sind, kodiert. Die cDNAs der anderen Isoformen humanen Tenascins sind in diesem Sequenzabschnitt verkürzt und kodieren für weniger als 12 dieser sich wiederholenden Einheiten.

Die Expression von Tenascin ist räumlich und zeitlich begrenzt und ihm wird eine Bedeutung während der Entwicklung eines Organismus sowie bei pathologischen Veränderungen zugeschrieben (Crossin, vide supra). Solche pathologischen Veränderungen sind beispielsweise Vitiligo, Tumore und Entzündungen.

Eine Möglichkeit zur Regulation der Genexpression bieten Antisense-Oligonukleotide (E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990); S. Agrawal, TIBTECH 1996, 376). In WO 94/21664 (L. Denner et al.) werden Antisense Oligonukleotide gegen Tenascin, die zur Inhibition der Proliferation der glatten Zellmuskulatur eingesetzt werden, beschrieben. Die dort beschriebenen Oligonukleotide haben eine Länge von mindestens 18 Nucleotiden.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, neue Oligonukleotide, die vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und die zur vollständigen und/oder teilweisen Inhibition der Genexpression von Tenascin verwendet werden können, bereitzustellen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Oligonukleotide, die eine Länge von bis zu 18 Nukleotiden aufweisen, die Expression von Tenascin effektiv beeinflussen können. Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Oligonukleotide mit 7-17 Nucleotideinheiten. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung weisen die Oligonukleotide eine Länge von 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 oder 7 Nukleotiden auf. Die Oligonukleotide entsprechen Abschnitten Tenascin-kodierender Sequenzen und die Oligonukleotide binden spezifisch an diese Tenascin-kodierenden Sequenzen (Nukleinsäuren), beispielsweise an das humane Tenascin-Gen und/oder humane Tenascin mRNA und/oder humane Tenascin cDNA. Die Abschnitte Tenascin-kodierender Sequenzen, denen die Oligonukleotide entsprechen, haben vorzugsweise eine Länge von 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 oder 7 Nukleotideinheiten (gilt insbesondere für die Bestimmung der Länge modifizierter und/oder chimärer Oligonukleotide bzw. von Oligonukleotid-Analoga).

In besonderen Ausführungsformen der Erfindung sind die Oligonukleotide gegen bestimmte Bereiche der Tenascin-kodierenden Sequenzen gerichtet, beispielsweise den Translationsstart, den 5'-nicht translatierten Bereich, den kodierenden Bereich und/oder den 3' nicht kodierenden Bereich. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung können die Oligonukleotide auch gegen Bereiche Tenascin-kodierender Sequenzen gerichtet sein, die für bestimmte Domänen des Tenascins kodieren, beispielsweise gegen die Cystein-reiche Domäne, gegen die zum EGF homologe Domäne, gegen die zum Fibronektin Typ III homologe Domäne und/oder die zum Fibrinogen homologe Domäne.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Oligonukleotide, die Sequenzabschnitten der humanen cDNA gemäß SEQ ID NO. 1 (Tabelle 1) entsprechen. Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Oligonukleotide, die Sequenzabschnitt

ten der cDNA mit der Gendatenbank Zugangsnummer X56160 entsprechen.

In speziellen Ausführungsformen der Erfindung kann ein Oligonukleotid beispielsweise eine der folgenden Sequenzen haben:

SEQ ID NO. 2: 3'-GGTTTGGGTGGAGGTGG-5'  
 SEQ ID NO. 3: 3'-GGAGGTGGTACCCCCGG-5' 5  
 SEQ ID NO. 4: 3'-GGTGGTACCCCCGG-5'  
 SEQ ID NO. 5: 3'-GGAGGTGGTACCCC-5'  
 SEQ ID NO. 6: 3'-AGAAAGAACGAAAGGAA-5'  
 SEQ ID NO. 7: 3'-GGAGGTGGTACC-5'  
 SEQ ID NO. 8: 3'-GGAGCGATGGCUCCA-5' 10  
 SEQ ID NO. 9: 3'-AAAGGAACGGGAGCG-5'  
 SEQ ID NO. 10: 3'-GCTCGGTHGGGTGG-5'  
 SEQ ID NO. 11: 3'-CTTACAGGTCCGTTGA-5'  
 SEQ ID NO. 12: 3'-GGCCGTGTTCTGCTGT-5'  
 SEQ ID NO. 13: 3'-TCACCCCTCTTTCTGG-5' 15  
 SEQ ID NO. 14: 3'-GGACACCGACACGG-5'  
 SEQ ID NO. 15: 3'-AACGGGAGCGATGG-5'  
 SEQ ID NO. 16: 3'-ATCTCGGGGTCGTC-5'  
 SEQ ID NO. 17: 3'-AAAGAACGAAAGGAA-5'  
 SEQ ID NO. 18: 3'-GGTGGTACCCC-5' 20  
 SEQ ID NO. 19: 3'-CCCGGTACTGA-5'  
 SEQ ID NO. 20: 3'-CCACAGAAAGAAC-5'.

Die Sequenzen SEQ ID NO. 2 bis SEQ ID NO. 20 entsprechen Abschnitten der Tenascin-kodierenden cDNA, wie sie in Tabelle 1 dargestellt ist. Ein Oligonukleotid, das eine der Sequenzen SEQ ID NO. 2 bis SEQ ID NO. 20 hat, ist komplementär zu einem entsprechenden Abschnitt einer Tenascin-kodierenden Nukleinsäure, z. B. einer humanen Tenascin cDNA und kann an diese Nukleinsäure binden. 25

Gegenstand der Erfindung sind auch Derivate des Oligonukleotids, beispielsweise dessen Salze, insbesondere dessen physiologisch verträglichen Salze. Unter physiologisch verträglichen Salzen werden in Wasser leicht lösliche, lösliche und wenig lösliche Verbindungen, beispielsweise gemäß der Definition im "Deutschen Arzneibuch" (9. Ausgabe 1986, Amtliche Ausgabe, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart), Seite 19, verstanden. Eine spezielle Ausführungsform der Erfindung betrifft das Natriumsalze des erfindungsgemäßen Oligonukleotids. 30

Ein Oligonukleotid kann beispielsweise vollständig aus den Nukleotiden Adenosinphosphat, Guanosinphosphat, Inosinphosphat, Cytidinphosphat, Uridinphosphat und Thymidinphosphat aufgebaut sein. In anderen Ausführungsformen der Erfindung kann ein Oligonukleotid gegebenenfalls ein oder mehrere Modifikationen, beispielsweise chemische Modifikationen, enthalten. Ein Oligonukleotid kann mehrere gleiche und/oder verschiedene Modifikationen aufweisen. 35

Beispiele für chemische Modifikationen sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543 und "Protocols for Oligonukleotides and Analogs" Synthesis and Properties & Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, Ed, Humana Press, Totowa, USA 1993 und S. T. Crooke, F. Bennet, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36 (1996) 107-129 beschrieben. 40

Die chemische Modifikation eines Oligonukleotids kann beispielsweise

- a) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der Phosphorsäurediesterbrücken durch modifizierte Phosphorbrücken, beispielsweise durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, NR<sup>1</sup>R<sup>1'</sup>-Phosphoramidat-, Boranophosphat-, Phosphat-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-Alkylester, Phosphat-[(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-Alkyl]ester, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)Alkylphosphonat- und /oder (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-Arylphosphonat-Brücken, wobei R<sup>1</sup> und R<sup>1'</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-alkyl, bevorzugt für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)-Alkyl und/oder Methoxyethyl, besonders bevorzugt für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl und/oder Methoxyethyl stehen oder R<sup>1</sup> und R<sup>1'</sup> zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann, bedeuten und/oder 45
- b) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken durch "Dephospho"-Brücken (beschrieben beispielsweise in Uhlmann, E. und Peyman, A. in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20, "Protocols for Oligonukleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, 355ff), beispielsweise durch Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylensulfon und/oder Silylgruppen bedeuten und/oder 50
- c) den vollständigen oder teilweisen Ersatz des Zuckerphosphat-Rückgrats, beispielsweise durch "Morpholinonucleosid"-Oligomere (beispielweise in E. P. Stürchak et al., Nucleic Acids Res. 17 (1989) 6129 beschrieben) und/oder durch Polyamid Nukleinsäuren ("PNAs") (beispielweise beschrieben in P. E. Nielsen et al, Bioconj. Chem. 5 (1994) 3) und/oder Phosphomonosäureester Nukleinsäuren ("PHONAs") (beschrieben beispielsweise in Peyman et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 (1996) 2632-2638) bedeuten und/oder 60
- d) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten, beispielsweise durch α-D-2'-Desoxyribose, L-2'-Desoxyribose, 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl]-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose, β-D-Xylofuranose, α-Arabinofuranose, 2,4-Dideoxy-β-D-erythro-hexo-pyranose, und carbocyclische (beschrieben beispielsweise in Froehler, 65

- J. Am. Chem. Soc. 114 (1992) 8320) und/oder offenkettige Zuckeranaloge (beschrieben beispielsweise in Vandendriessche et al., Tetrahedron 49 (1993) 7223) und/oder Bicyclo-Zuckeranaloge (beschrieben beispielsweise in M. Tarkov et al., Helv. Chim. Acta 76 (1993) 481) bedeuten und/oder
- 5 e) die Modifikation beziehungsweise den vollständigen oder teilweisen Ersatz der natürlichen Nucleosid-Basen, beispielsweise durch 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyluracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin und/oder 7-Deaza-7-substituierte Purine bedeuten und/oder
- 10 f) die Konjugation mit einem oder mehreren Molekülen, die die Eigenschaften der Oligonukleotids an spezielle Anforderungen anpassen können, beispielsweise die Konjugation eines Oligonukleotids mit einem oder mehreren Molekülen, welche die Eigenschaften (beispielsweise Zellpenetration, Nucleasestabilität, Affinität zur Tenascinkodierenden Target-Sequenz, Pharmakokinetik) des Oligonukleotids, z. B. die eines Antisense-Oligonukleotids und/oder eines Tripelhelix-bildenden Oligonukleotids günstig beeinflussen und/oder bei der Hybridisierung des modifizierten Oligonukleotids an die Target-Sequenz diese unter Bindung und/oder Quervernetzung angreifen kann (Oligonukleotid-Konjugate), bedeuten. Beispiele dafür sind Konjugate mit Poly-Lysin, mit Interkalatoren wie Pyren, Acridin, Phenazin, Phenanthridin, mit fluoreszierenden Verbindungen wie Fluorescein, mit Cross-Linkern wie Psoralen, Azidoproflavin, mit lipophilen Molekülen wie (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, mit Lipiden wie 1,2-Di-hexadecyl-rac-glycerin, mit Steroiden wie Cholesterin und/oder Testosteron, mit Vitaminen wie Vitamin E, mit Poly- bzw. Oligoethylenglycol, mit (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern und/oder mit -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-O-(C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl. Solche Moleküle können am 5'- und/oder am 3'-Ende und/oder innerhalb der Sequenz, z. B. über eine Nucleobase an das Oligonukleotid konjugiert sein.
- 20 Verfahren zur Herstellung eines Oligonukleotid-Konjugats sind dem Fachmann bekannt und z. B. in Uhlmann, E. & Peyman, A., Chem. Rev. 90 (1990) 543 und/oder M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, S.303ff. und/oder EP-A 0 552 766 beschrieben.
- 25 g) Weiterhin kann in speziellen Ausführungsformen der Erfindung das Oligonukleotid am 3' und/oder am 5'-Ende 3'-3'- und/oder 5'-5'-Inversionen aufweisen. Diese Art der chemischen Modifikation ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757 beschrieben.
- 30 In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung weist das Oligonukleotid eine oder mehrere chemische Modifikationen auf, die unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus der Reihe enthaltend
- a) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der Phosphorsäurediesterbrücken durch Phosphorothioat- und/oder (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkylphosphonat-Brücken,
- 35 b) den vollständigen oder teilweisen Ersatz des Zuckerphosphat-Rückgrats durch "PNAs" und/oder PHONAs,
- c) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-Ribose und/oder 2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl]-Ribose,
- d) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der natürlichen Nucleosid-Basen durch 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil und/oder 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin,
- 40 e) die 3'-3'-Inversionen am 3'-Ende des Oligonukleotids,
- f) die Konjugation des Oligonukleotids mit einem oder mehreren Molekülen, die unabhängig voneinander ausgewählt werden können, aus der Reihe enthaltend lipophile Moleküle, z. B. (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, Lipide, z. B. 1,2-Di-hexadecyl-rac-glycerin, Steroide, z. B. Cholesterin und/oder Testosteron, Vitamine, z. B. Vitamin E, Poly- bzw. Oligoethylenglycol, (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern und -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-O-(C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl.
- 45 In anderen bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung weist das Oligonukleotid eine oder mehrere chemische Modifikationen auf, die unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus der Reihe enthaltend
- a) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der Phosphorsäurediesterbrücken durch Phosphorothioat-Brücken,
- 50 b) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der β-D-2'-Desoxyriboseeinheiten durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-Ribose und/oder 2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl]-Ribose,
- c) die Konjugation mit lipophilen Molekülen, z. B. (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, mit Lipiden, z. B. 1,2-Di-hexadecyl-rac-glycerin, mit (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern und/oder mit -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-O-(C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl.
- 55 In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Oligonukleotid bereitgestellt, das eine oder mehrere Modifikationen aufweisen kann und das eine der Sequenzen SEQ ID NO. 2 – SEQ ID NO. 20 aufweist bzw. das einer der Sequenzen SEQ ID NO. 2 bis SEQ ID NO. 20 entspricht bzw. das den entsprechenden Sequenz-Abschnitten einer Tenascinkodierenden Sequenz entspricht und an diesen Abschnitt der Tenascinkodierenden Sequenz binden kann.
- In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden Oligonukleotide bereitgestellt, in deren Sequenz jedes
- 60 Nukleotid modifiziert ist. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist beispielsweise das Oligonukleotid vollständig aus Phosphorothioaten aufgebaut (durchgängig modifiziertes Phosphothioat). In einer weiteren speziellen Ausführungsform der Erfindung werden Oligonukleotide bereitgestellt, die den Sequenzen SEQ ID NO. 2 – SEQ ID NO. 20 entsprechen, wobei aber die Phosphodiester Brücken zwischen den einzelnen Nukleosiden (d. h. die Phosphatgruppen zwischen den einzelnen Nukleosiden) vollständig durch Phosphothioat Brücken (d. h. Phosphothioatgruppen zwischen den Nukleosiden) ersetzt sind.
- 65 In einer weiteren besonderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Oligonukleotid bereitgestellt, indem nur ein Teil der Phosphodiester Brücken durch Phosphothioat Brücken ersetzt ist. Insbesondere beinhaltet die Erfindung Oligonukleotide die nur minimal modifiziert sind. Das Prinzip der minimal modifizierten Oligonukleotide ist beschrieben in A.

Peyman, E. Uhlmann, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 377 (1996) 67–70. Dabei werden 1–3 endständige Nucleotid-Einheiten am 5'- und am 3'-Ende und zusätzlich ausgewählte interne Pyrimidin-Positionen durch Phosphorothioate geschützt. Minimal modifizierte Oligonukleotide weisen besonders vorteilhafte Eigenschaften auf, beispielsweise zeigen sie besondere Nukleasestabilität bei minimaler Modifikation.

Spezielle Ausführungsformen der Erfindung beinhalten ein minimal modifiziertes Oligonukleotid, das ist eine der Sequenzen, ausgewählt aus der Reihe der Sequenzen SEQ ID NO. 21 bis SEQ ID NO. 39, aufweist.

SEQ ID NO. 21: 3'-GsGsTsTsTGGGTsGGAGGsTsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 22: 3'-GsGsAsGGTsGGTsACsCCsCCsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 23: 3'-GsGsTGGTsACsCCsCCsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 24: 3'-GsGsAGGTsGGTsACsCsCsC-5'  
 SEQ ID NO. 25: 3'-AsGsAAAGAAsCsGAAAGGsAsA-5'  
 SEQ ID NO. 26: 3'-GsGsAGGTsGGTsAsCsC-5'  
 SEQ ID NO. 27: 3'-GsGsAGCsGATsGGCsTsTsCsCsA-5'  
 SEQ ID NO. 28: 3'-AsAsAGGAACsGGGAGsCsG-5'  
 SEQ ID NO. 29: 3'-GsGsTCGGTsTsTGGGTsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 30: 3'-CsTsTACAGGTsCsCGTsTsGsA-5'  
 SEQ ID NO. 31: 3'-GsGsCsCGsTGTsTCGCsTsGsT-5'  
 SEQ ID NO. 32: 3'-TsCsACsCCsCTsCsusTsCsTsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 33: 3'-GsGsAsCACsCGACsACsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 34: 3'-AsAsCsGGGAGCGATsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 35: 3'-AsTsCsTCGGGGTsCsGsTsC-5'  
 SEQ ID NO. 36: 3'-AsAsAGAACsGAAAGGsAsA-5'  
 SEQ ID NO. 37: 3'-GsGsTGGTsACsCsCsC-5'  
 SEQ ID NO. 38: 3'-CsCsCsGGTsACsTsGsA-5'  
 SEQ ID NO. 39: 3'-CsCsAsCAGAAAGsAsAsC-5'.

Die Sequenzen SEQ ID NO. 21 bis SEQ ID NO. 39 entsprechen den Sequenzen SEQ ID NO. 2 – SEQ ID NO. 20, d. h. sie können an die gleichen Bereiche einer Tenascin-kodierenden Sequenz binden, wobei allerdings im Gegensatz den SEQ ID NO. 2–20 ein Teil der Phosphodiester Brücken durch Phosphothioat-Brücken (in der Sequenz durch ein "s" gekennzeichnet) ersetzt ist.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft chimäre Oligonukleotide. Ein chimäres Oligonukleotid ist aus mindestens zwei verschiedenen Sequenzabschnitten aufgebaut, beispielsweise aus einem DNA-Abschnitt und einem modifizierten Abschnitt, z. B. einem PNA-Abschnitt. Diese unterschiedlichen Abschnitte verleihen dem gesamten Oligonukleotid besondere Eigenschaften.

Eine besondere Form chimärer Oligonukleotide ist beispielsweise in Matteucci und Wagner, Nature 384 SUPP (1996) 20–22 beschrieben. Ein chimäres Oligonukleotid kann z. B. 1. eine sogenannte "Core Sequenz", die aus etwa sieben Nukleotiden besteht und die die RNase H aktivieren kann sowie 2. eine oder mehrere flankierende Sequenzen, welche die Affinität, Spezifität und/oder Nuklease-Stabilität des Oligonukleotids erhöhen, enthalten. Beispielsweise kann die "Core Sequenz" Phosphorothioat und/oder Phosphodiester Brücken enthalten. Als flankierende Sequenzen eignen sich beispielsweise PNAs und/oder 2'-O-Alkyl-Derivate wie etwa 2'-O-Methyl und/oder 2'-O-Propyl und/oder 2'-Methoxyethoxy-Derivate.

Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein chimäres Oligonukleotid, das eine der Sequenzen SEQ ID NO. 40 – SEQ ID NO. 58 aufweist, wobei  
 x unabhängig voneinander für Phosphorothioat und/oder Phosphodiester steht und  
 y unabhängig voneinander für 2'-O-Methyl und/oder 2'-O-Propyl und/oder 2'-Methoxyethoxy und/oder einen PNA-Baustein steht:

SEQ ID NO. 40: 3'-GyGyTyTyTyGxGxGxTxGxGxGxGyGyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 41: 3'-GyGyAyGyGyTxGxGxTxAxGxGxGxGyGyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 42: 3'-GyGyTxGxGxTxAxGxGxGxGyGyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 43: 3'-GyGyAyGyGxTxGxGxTxAxGyGyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 44: 3'-AyGyAyAxG:AAAxGxGxGxGxGyGyAyA-5'  
 SEQ ID NO. 45: 3'-GyGyAxGxGxTxGxGxTxGyGyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 46: 3'-GyGyAxGxGxGxTxGyGyTyTyGyGyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 47: 3'-AyAyAyGxGxGxGxGxGyGyAyGyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 48: 3'-GyGyTyGxGxGxTxTxGxGyGyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 49: 3'-CyTyTyAxGxGxGxTxGxGxGyTyTyGyA-5'  
 SEQ ID NO. 50: 3'-GyGyCyGxGxTxGxTxTxGxGyGyTyGyT-5'  
 SEQ ID NO. 51: 3'-TyCyAyGxGxGxTxTxTxTyTyTyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 52: 3'-GyGyAyGxGxGxGxGxGxGyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 53: 3'-AyAyCyGxGxGxGxGxGxGyTyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 54: 3'-AyTyTyTxGxGxGxGxTxGyTyG-5'  
 SEQ ID NO. 55: 3'-AyAyAyGxGxGxGxGxGxGxGyGyAyA-5'  
 SEQ ID NO. 56: 3'-GyGyTxGxGxTxAxGyGyTyG-5'  
 SEQ ID NO. 57: 3'-CyGxGxGxTxAxGyTyGyA-5'  
 SEQ ID NO. 58: 3'-CyCyAxGxGxGxGxGxGyAyGyA-5'.

Die Sequenzen SEQ ID NO. 40 – SEQ ID NO. 58 entsprechen den oben genannten Sequenzen SEQ ID NO. 2 bis SEQ ID NO. 20, d. h. sie binden an die entsprechenden Sequenzabschnitte einer Tenascin-kodierenden Sequenz, wobei allerdings die genannten Modifikationen enthalten sind.

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung der Oligonukleotide. Die beschriebenen Oligonukleotide können mit Hilfe verschiedener bekannter, chemischer Verfahren, z. B. unter Anwendung der Standard Phosphoramidit-Chemie unter Verwendung von Jod bzw. TED (Tetraethylthiuramdisulfid) als Oxidationsmittel, hergestellt werden. Dieses Verfahren ist z. B. in Eckstein, F. (1991) "Oligonukleotides and Analogues, A Practical Approach", IRL Press, Oxford beschrieben. Die Oligonukleotide können auch durch Verfahren hergestellt werden, die gegebenenfalls einen oder mehrere enzymatische Schritte enthalten.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der Oligonukleotide. Die Oligonukleotide können zur Hybridisierung bzw. Bindung an Tenascin-kodierende (einzelssträngige und/oder doppelsträngige) Nukleinsäuren, beispielsweise DNA (z. B. Gene, cDNA) und/oder RNA (z. B. pre-mRNA, mRNA) verwendet werden. Insbesondere betrifft dies die Verwendung der Oligonukleotide zur Hybridisierung mit bzw. Bindung an Nukleinsäuren, die die Sequenz SEQ ID NO. 1 gemäß Tabelle 1 aufweisen bzw. mit Nukleinsäuren, die Teile dieser Sequenz aufweisen (beispielsweise Sequenzen, die für Tenascin Isoformen kodieren) bzw. mit Nukleinsäuren, deren Sequenz geringfügig von diesen Sequenzen abweicht (die z. B. eine oder mehrere Punktmutationen aufweisen).

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Oligonukleotide zur Modulation sowie zur ganzen oder teilweisen Inhibition der Expression von Tenascin bzw. verschiedener Tenascin Isoformen bzw. von Mutanten derselben, beispielsweise zur ganzen oder teilweisen Inhibition der Transkription und/oder der Translation.

Die Erfindung betrifft beispielsweise die Verwendung der Oligonukleotide als Antisense Oligonukleotide. Darüber hinaus können die Oligonukleotide als Hilfsmittel in der Molekularbiologie verwendet werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Oligonukleotide als Arzneimittel und/oder Diagnostikum bzw. die Verwendung der Oligonukleotide zur Herstellung von Arzneimitteln und/oder Diagnostika. Insbesondere können die Oligonukleotide in Arzneimitteln, die zur Prävention und/oder Behandlung von Krankheiten, die mit der Expression bzw. einer Überexpression von Tenascin einhergehen, eingesetzt werden. Da die Expression von Tenascin normalerweise, d. h. z. B. beim gesunden Menschen räumlich und zeitlich begrenzt ist, kann ein Abweichen von dieser normalen räumlichen und zeitlichen Expression, als Überexpression angesehen werden. Weiterhin können die Oligonukleotide für die Diagnose bzw. Früherkennung solcher Krankheiten eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der Oligonukleotide bzw. von Arzneimitteln, die diese Oligonukleotide enthalten, zur Behandlung von Krankheiten, bei denen Tenascin bzw. eine Überexpression von Tenascin ursächlich bzw. beteiligt ist.

Die Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung der Oligonukleotide zur Behandlung und/oder Prävention von Krankheiten, bei denen eine Fehlsteuerung bzw. Störung der Einwanderung bzw. des Vorhandenseins bzw. der Einlagerung von Melanocyten in Epithelzellschichten, beispielsweise in Epithelzellschicht der Epidermis, der Aderhaut des Auges oder der Substantia nigra, zugrunde liegt bzw. beteiligt ist.

Die Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung der Oligonukleotide zur Behandlung von Vitiligo und anderen Depigmentierungskrankheiten bzw. Depigmentierungsstörungen (z. B. der Haut, Haare, Augen) beispielsweise Albinismus und/oder die Verwendung der Oligonukleotide zur Behandlung von Psoriasis und/oder zur Behandlung von Krebs, z. B. zur Inhibitoren von Tumorstadium und Tumormetastasierung, beispielsweise bei Melanomen und/oder zur Behandlung von Entzündungen, insbesondere als Entzündungshemmer und/oder zur Behandlung und/oder Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen, beispielsweise der Restenose.

Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung der Oligonukleotide zur Behandlung von Vitiligo bzw. zur Herstellung von Arzneimitteln, die zur Behandlung von Vitiligo verwendet werden können. Die Erfindung betrifft darüber hinaus ganz allgemein (d. h. auch Oligonukleotide mit einer Länge von größer oder gleich 18 Nukleotiden) die Verwendung von Oligonukleotiden zur Behandlung von Vitiligo bzw. die Herstellung von Arzneimitteln, die zur Behandlung von Vitiligo verwendet werden können.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung zur Behandlung von Vitiligo in Kombination mit bekannten therapeutischen Verfahren, beispielsweise in Kombination a) mit Photochemotherapie (PUVA), z. B. unter Verwendung von Methoxypsoralen, Phenylalanin und/oder Khellin und/oder b) mit der Transplantation von kultivierten Melanocyten ("epidermal grafting") und/oder c) mit einer Steroid-Behandlung und/oder d) mit einer Behandlung mit Plazenta-Extrakt und/oder e) mit einer Behandlung mit Pseudocatalase.

Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln (pharmazeutischen Zubereitungen). Zur Herstellung von Arzneimitteln werden ein oder mehrere verschiedene Oligonukleotide bzw. deren physiologisch verträgliche Salze vermischt, wobei gegebenenfalls weitere pharmazeutische Träger- und/oder Zusatzstoffe zugegeben werden können.

Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zubereitungen, die ein oder mehrere verschiedene Oligonukleotide und/oder deren physiologisch verträgliche Salze sowie gegebenenfalls pharmazeutische Träger- und/oder Zusatzstoffe enthalten.

Das bzw. die Oligonukleotid(e) und/oder deren physiologisch verträgliche Salze können am Tier, bevorzugt am Säugtier, insbesondere am Menschen als Arzneimittel für sich allein, in Mischungen untereinander oder in Form von pharmazeutischen Zubereitungen verabreicht werden. Die Arzneimittel können eine topische, perkutane, parenterale und/oder enterale Anwendung gestatten. Die jeweils bevorzugte Anwendungsform hängt von den jeweils speziellen Gegebenheiten ab. Zur Behandlung von Vitiligo beispielsweise wird eine topische Anwendung, z. B. in Form von Salben, Lotionen oder Tinkturen, Emulsionen, Suspensionen bevorzugt. Ebenso hängt die Häufigkeit der Applikation von den individuellen Gegebenheiten ab. Zur Behandlung von Vitiligo kann beispielsweise eine topische Komposition ein bis zweimal am Tag auf die depigmentierte Hautstelle aufgetragen werden.

Arzneimittel bzw. pharmazeutische Zubereitungen können als aktiven Bestandteil eine wirksame Dosis mindestens eines Oligonukleotids und/oder eine Mischung mehrerer Oligonukleotide und gegebenenfalls zusätzliche, pharmazeutisch

einwandfreie Träger- und/oder Zusatzstoffe enthalten. Eine pharmazeutische Zubereitung kann etwa 0,1% (Gewichtsprozent) oder weniger bis etwa 90% (Gewichtsprozent) oder mehr des therapeutisch wirksamen Oligonukleotids bzw. der pharmazeutisch wirksamen Oligonukleotide enthalten.

Die pharmazeutisch wirksame Dosis des jeweiligen Oligonukleotids bzw. eines Oligonukleotids, welches Bestandteil einer Mischung verschiedener Oligonukleotide ist, kann innerhalb weiter Grenzen variieren und ist in jedem einzelnen Fall den individuellen Gegebenheiten anzupassen.

Die Herstellung der pharmazeutischen Zubereitungen kann in an sich bekannter Weise, z. B. beschrieben in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA. durchgeführt werden, wobei gegebenenfalls pharmazeutisch inerte anorganische und/oder organische Trägerstoffe verwendet werden können. Für die Herstellung von Pillen, Tabletten, Dragees und/oder Hartgelatine kapseln können z. B. Lactose, Maisstärke und/oder Derivate derselben, Talk, Stearinsäure und/oder deren Salze verwendet werden. Als Trägerstoffe für Weichgelatine kapseln und/oder Suppositorien können z. B. Fette, Wachse, halbfeste und/oder flüssige Polyole, natürliche und/oder gehärtete Öle verwendet werden. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Lösungen und/oder Sirupen können z. B. Wasser, Saccharose, Invertzucker, Glukose und/oder Polyole verwendet werden. Als Trägerstoffe für die Herstellung von Injektionslösungen können z. B. Wasser, Alkohole, Glycerin, Polyole und/oder pflanzliche Öle verwendet werden. Als Trägerstoffe für Mikrokapseln, Implantate und/oder Rods können beispielsweise Mischpolymerisate, z. B. aus Glykolsäure und Milchsäure verwendet werden. Darüber hinaus sind Liposomenformulierungen, die dem Fachmann bekannt sind (N. Weiner, Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics, Springer Verlag 1992), beispielsweise HVJ-Liposomen (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878) geeignet. Die dermale Applikation kann beispielsweise auch unter Zuhilfenahme ionophoretischer Methoden und/oder mit Hilfe der Elektroporation erfolgen. Darüber hinaus können Lipofektine und/oder andere (Nukleinsäure- bzw. DNA-) Carriersysteme, beispielsweise solche, die in der Gentherapie Anwendung finden, verwendet werden. Insbesondere sind Systeme geeignet, mit deren Hilfe Oligonukleotide mit großer Effizienz in eukaryotische Zellen bzw. die Kerne eukaryotischer Zellen eingebracht werden können.

Eine pharmazeutische Zubereitung kann neben den Wirk- und Trägerstoffen noch Zusatzstoffe, wie z. B. Füllstoffe, Streck-, Spreng-, Binde-, Gleit-, Netz-, Stabilisierungs-, Emulgier-, Konservierungs-, Süß-, Färb-, Geschmacks- oder Aromatisierungs-, Dickungs-, Verdünnungsmittel, Puffersubstanzen, ferner Lösungsmittel und/oder Lösungsvermittler und/oder Mittel zur Erzielung eines Depoteffekts, sowie Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Überzugsmittel und/oder Antioxidantien enthalten. Sie können auch zwei oder mehrere verschiedene Oligonukleotide und/oder deren physiologisch verträgliche Salze enthalten sowie ferner neben mindestens einem Oligonukleotid einen oder mehrere andere therapeutisch wirksame Stoffe.

#### Beispiele

##### Beispiel 1

##### Oligonukleotidsynthese

Oligonukleotide wurden auf einem automatischen DNA Synthesizer (Applied Biosystems Model 380B oder 394) unter Anwendung der Standard Phosphoramidit-Chemie und Oxidation mit Jod synthetisiert (F. Eckstein, Ed "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", IRL Press, Oxford, 1991). Zur Einführung von Phosphorothioat-Brücken in gemischten Phosphorothioaten und Phosphodiester Oligonukleotiden wurde anstelle von Jod mit TETD (Tetraethylthiuramdisulfid) oxidiert (Applied Biosystems User Bulletin 65). Nach Abspaltung vom festen Träger (CPG oder Tentagel) und Entfernung der Schutzgruppen mit konz.  $\text{NH}_3$  bei  $55^\circ\text{C}$  (18 h) wurden die Oligonukleotide zunächst durch Butanol-Fällung (Sawadogo, Van Dyke, Nucl. Acids Res. 19 (1991) 674) gereinigt. Das Natriumsalz wurde dann durch Ausfällung aus einer 0,5 M NaCl Lösung mit 2,5 Volumenteilen Ethanol erhalten.

Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe der

a) Analytischen Gelelektrophorese (Gel: 20% Acrylamid, 8M Harnstoff; Laufpuffer:

454 M Tris-borat Puffer, pH 7.0) und/oder

b) HPLC-Analyse (Säulenmaterial: Waters GenPak FAX; Gradient:  $\text{CH}_3\text{CN}$  (400 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (1.6 l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (3.1 g), NaCl (11.7 g), pH 6.8 (0.1 M an NaCl) nach  $\text{CH}_3\text{CN}$  (400 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (1.6 l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (3.1 g), NaCl (175.3 g), pH 6.8 (1.5 M an NaCl)) und/oder

c) Kapillargelelektrophorese (Beckmann Kapillare eCAP<sup>TM</sup>, U100P Gel Column, 65 cm length, 100 mm I.D., window 15 cm from one end; Puffer: 140 pM Tris, 360 mM Borsäure, 7M Harnstoff) und/oder

d) Elektrospray Massenspektroskopie

analysiert.

Die Analyse des Oligonukleotids ergab, daß dieses jeweils in einer Reinheit von größer 90% vorlag.

##### Synthetisiertes Oligonukleotid

ODN1 (Sequenz SEQ ID NO. 24): 3'-GsAGGTsGGTsACsCsC-5'

##### Beispiel 2

##### Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung

50 mg ODN 1 aus Beispiel 1 werden mit 1g Dermatop<sup>®</sup> (Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt am Main, Germany)

Basiscreme eng vermischt und die Mischung bei Temperaturen < 10 °C aufbewahrt.

## Beispiel 3

- 5 Die Creme aus Beispiel 2 soll zweimal täglich (morgens und nachmittags bzw. abends) auf eine depigmentierte Hautstelle eines Vitiligo-Patienten aufgetragen werden.

Tabelle 1

Sequenz SEQ ID NO. 1

10

Sequenz der humanen Tenascin cDNA nach A. Siri et al. Nucl. Acids Res. 19  
(1991) 525-531.

15

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 20 | GAATTCGCTA GAGCCCTAGA GCCCCAGCAG CACCCAGCCA AACCCACCTC CACCATGGGG  | 60  |
| 25 | GCCATGACTC AGCTGTTGGC AGGTGTCTTT CTTGCTTTCC TTGCCCTCGC TACCGAAGGT  | 120 |
| 30 | GGGGTCCTCA AGAAAGTCAT CCGGCACAAG CGACAGAGTG GGGTGAACGC CACCCTGCCA  | 180 |
| 35 | GAAGAGAACC AGCCAGTGGT GTTTAACCAC GTTTACAACA TCAAGCTGCC AGTGGGATCC  | 240 |
| 40 | CAGTGTTTCGG TGGATCTGGA GTCAGCCAGT GGGGAGAAAG ACCTGGCACC GCCTTCAGAG | 300 |
| 45 | CCCAGCGAAA GCTTTCAGGA GCACACAGTA GATGGGGAAA ACCAGATTGT CTTACACAT   | 360 |
| 50 | CGCATCAACA TCCCCGCGG GGCCTGTGGC TGTGCCGAG CCCCTGATGT TAAGGAGCTG    | 420 |
| 55 | CTGAGCAGAC TGGAGGAGCT GGAGAACCTG GTGTCTTCCC TGAGGGAGCA ATGTACTGCA  | 480 |
| 60 | GGAGCAGGCT GCTGTCTCCA GCCTGCCACA GGCCGCTTGG ACACCAGGCC CTTCTGTAGC  | 540 |
| 65 | GGTCGGGGCA ACTTCAGCAC TGAAGGATGT GGCTGTGTCT GCGAACCTGG CTGGAAAGGC  | 600 |
| 70 | CCCAACTGCT CTGAGCCCGA ATGTCCAGGC AACTGTCACC TTCGAGGCCG GTGCATTGAT  | 660 |
| 75 | GGGCAGTGCA TCTGTGACGA CGGCTTCACG GGCGAGGACT GCAGCCAGCT GCCTTGCCCC  | 720 |
| 80 | AGCGACTGCA ATGACCAGGG CAAGTGCGTG AATGGAGTCT GCATCTGTTT CGAAGGCTAC  | 780 |
| 85 | GCGGCTGACT GCAGCCGTGA AATCTGCCCA GTGCCCTGCA GTGAGGAGCA CGGCACATGT  | 840 |
| 90 | GTAGATGGCT TGTGTGTGTG CCACGATGGC TTTGCAGGCG ATGACTGCAA CAAGCCTCTG  | 900 |



# DE 197 50 702 A 1

|  |                 |    |
|--|-----------------|----|
| TGTCTCAACA ATTGCTACAA CCGTGGACGA TCGTGGAGA ATGAGTGCCT GTGTGATGAG             | 960             |    |
| GGTTTCACGG GCGAAGACTG CAGTGAGCTC ATCTGCCCCA ATGACTGCTT CGACCGGGGC            | 1020            | 5  |
| CGCTGCATCA ATGGCACCTG CTACTGCGAA GAAGGCTTCA CAGGTGAAGA CTGCGGGAAA            | 1080            | 10 |
| <del>CCCACCTGCC CACATGCCTG CCACACCCAG GGCCGGTGTG AGGAGGGGCA GTGTGTATGT</del> | <del>1140</del> |    |
| GATGAGGGCT TTGCCGGTGT GGAAGTGCAGC GAGAAGAGGT GTCCTGCTGA CTGTCACAAT           | 1200            | 15 |
| CGTGGCCGCT GTGTAGACGG GCGGTGTGAG TGTGATGATG GTTTCAGTGG AGCTGACTGT            | 1260            | 20 |
| GGGGAGCTCA AGTGTCCCAA TGGCTGCAGT GGCCATGGCC GCTGTGTCAA TGGGCAGTGT            | 1320            |    |
| GTGTGTGATG AGGGCTATAC TGGGGAGGAC TGCAGCCAGC TACGGTGCCC CAATGACTGT            | 1380            | 25 |
| CACAGTCGGG GCCGCTGTGT CGAGGGCAAA TGTGTATGTG AGCAAGGCTT CAAGGGCTAT            | 1440            | 30 |
| GACTGCAGTG ACATGAGCTG CCCTAATGAC TGTCACCAGC ACGGCCGCTG TGTGAATGGC            | 1500            |    |
| ATGTGTGTTT GTGATGACGG CTACACAGGG GAAGACTGCC GGGATCGCCA ATGCCCCAGG            | 1560            | 35 |
| GACTGCAGCA ACAGGGGCCT CTGTGTGGAC GGACAGTGCG TCTGTGAGGA CGGCTTCACC            | 1620            | 40 |
| GGCCCTGACT GTGCAGAACT CTCCTGTCCA AATGACTGCC ATGGCCAGGG TCGCTGTGTG            | 1680            |    |
| AATGGGCAGT GCGTGTGCCA TGAAGGATTT ATGGGCAAAG ACTGCAAGGA GCAAAGATGT            | 1740            | 45 |
| CCCAAGTACT GTCATGGCCA GGGCCGCTGC GTGGACGGCC AGTGCATCTG CCACGAGGGC            | 1800            | 50 |
| TTCACAGGCC TGGACTGTGG CCAGCACTCC TGCCCCAGTG ACTGCAACAA CTTAGGACAA            | 1860            |    |
| TGCGTCTCGG GCCGCTGCAT CTGCAACGAG GGCTACAGCG GAGAAGACTG CTCAGAGGTG            | 1920            | 55 |
| TCTCCTCCCA AAGACCTCGT TGTGACAGAA GTGACGGAAG AGACGGTCAA CCTGGCCTGG            | 1980            | 60 |

65

# DE 197 50 702 A 1

|    |   |                 |
|----|---|-----------------|
|    | <del>GACAATGAGA TGC GGGTCAC AGAGTACCTT GTCGTGTACA CGCCGACCCA CGAGGGTGGT</del> | <del>2040</del> |
| 5  | CTGGAAATGC AGTTCCGTGT GCCTGGGGAC CAGACGTCCA CCATCATCCG GGAGCTGGAG             | 2100            |
|    | CCTGGTGTGG AGTACTTTAT CCGTGTATTT GCCATCCTGG AGAACAAGAA GAGCATTCCT             | 2160            |
| 10 |   |                 |
|    | <del>GTCAGCGCCA GGGTGGCCAC GTACTTACCT GCACCTGAAG GCCTGAAATT CAAGTCCATC</del>  | <del>2220</del> |
| 15 | AAGGAGACAT CTGTGGAAGT GGAGTGGGAT CCTCTAGACA TTGCTTTTGA AACCTGGGAG             | 2280            |
|    | ATCATCTTCC GGAATATGAA TAAAGAAGAT GAGGGAGAGA TCACCAAAAG CCTGAGGAGG             | 2340            |
| 20 |   |                 |
|    | CCAGAGACCT CTTACCGGCA AACTGGTCTA GTCCTGGGC AAGAGTATGA GATATCTCTG              | 2400            |
| 25 | CACATAGTGA AAAACAATAC CCGGGGCCCT GGCCTGAAGA GGGTGACCAC CACACGCTTG             | 2460            |
|    | GATGCCCCCA GCCAGATCGA GGTGAAAGAT GTCACAGACA CCACTGCCTT GATCACCTGG             | 2520            |
| 30 |   |                 |
|    | TTCAAGCCCC TGGCTGAGAT CGATGGCATT GAGCTGACCT ACGGCATCAA AGACGTGCCA             | 2580            |
| 35 | GGAGACCGTA CCACCATCGA TCTCACAGAG GACGAGAACC AGTACTCCAT CGGGAACCTG             | 2640            |
|    | AAGCCTGACA CTGAGTACGA GGTGTCCCTC ATCTCCGCA GAGGTGACAT GTCAAGCAAC              | 2700            |
| 40 |   |                 |
|    | CCAGCCAAAG AGACCTTCAC AACAGGCCTC GATGCTCCA GGAATCTTCG ACGTGTTTCC              | 2760            |
| 45 | CAGACAGATA ACAGCATCAC CCTGGAATGG AGGAATGGCA AGGCAGCTAT TGACAGTTAC             | 2820            |
|    | AGAATTAAAGT ATGCCCCCAT CTCTGGAGGG GACCACGCTG AGGTTGATGT TCCAAAGAGC            | 2880            |
| 50 |   |                 |
|    | CAACAAGCCA CAACCAAAAC CACTCTACA GGTCTGAGGC CGGGAAGTGA ATATGGGATT              | 2940            |
| 55 | GGAGTTTCTG CTGTGAAGGA AGACAAGGAG AGCAATCCAG CGACCATCAA CGCAGCCACA             | 3000            |
| 60 | GAGTTGGACA CGCCCAAGGA CCTTCAGGTT TCTGAAACTG CAGAGACCAG CCTGACCCTG             | 3060            |
| 65 |   |                 |

# DE 197 50 702 A 1

|  |                 |    |
|--|-----------------|----|
| CTCTGGAAGA CACCGTTGGC CAAATTTGAC CGCTACCGCC TCAATTACAG TCTCCCCACA            | 3120            |    |
| GGCCAGTGGG TGGGAGTGCA GCTTCCAAGA AACACCACTT CCTATGTCCT GAGAGGCCTG            | 3180            | 5  |
| GAACCAGGAC AGGAGTACAA TGTCTCCTG ACAGCCGAGA AAGGCAGACA CAAGAGCAAG             | 3240            | 10 |
| <del>CCCGCACGTG TGAAGGCATC CACTGAACAA GCCCCTGAGC TGGAAAACCT CACCGTGACT</del> | <del>3300</del> |    |
| GAGGTTGGCT GGGATGGCCT CAGACTCAAC TGGACCGCGG CTGACCAGGC CTATGAGCAC            | 3360            | 15 |
| TTTATCATTG AGGTGCAGGA GGCCAACAAG GTGGAGGCAG CTCGGAACCT CACCGTGCCT            | 3420            | 20 |
| GGCAGCCTTC GGGCTGTGGA CATACCGGGC CTCAAGGCTG CTACGCCTTA TACAGTCTCC            | 3480            |    |
| ATCTATGGGG TGATCCAGGG CTATAGAACA CCAGTGCTCT CTGCTGAGGC CTCCACAGGG            | 3540            | 25 |
| GAAACTCCCA ATTTGGGAGA GGTCGTGGTG GCCGAGGTGG GCTGGGATGC CCTCAAACCTC           | 3600            | 30 |
| AACTGGACTG CTCCAGAAGG GGCCTATGAG TACTTTTTCA TTCAGGTGCA GGAGGCTGAC            | 3660            |    |
| ACAGTAGAGG CAGCCCAGAA CCTCACCGTC CCAGGAGGAC TGAGGTCCAC AGACCTGCCT            | 3720            | 35 |
| GGGCTCAAAG CAGCCACTCA TTATACCATC ACCATCCGCG GGGTCACTCA GGACTTCAGC            | 3780            | 40 |
| ACAACCCCTC TCTCTGTTGA AGTCTTGACA GAGGAGGTTC CAGATATGGG AAACCTCACA            | 3840            |    |
| GTGACCGAGG TTAGCTGGGA TGCTCTCAGA CTGAACTGGA CCACGCCAGA TGGAACCTAT            | 3900            | 45 |
| GACCAGTTTA CTATTCAGGT CCAGGAGGCT GACCAGGTGG AAGAGGCTCA CAATCTCACG            | 3960            | 50 |
| GTTCTTGCCA GCCTGCGTTC CATGGAAATC CCAGGCCTCA GGGCTGGCAC TCCTTACACA            | 4020            |    |
| GTCACCCTGC ACGGCGAGGT CAGGGGCCAC AGCACTCGAC CCCTTGCTGT AGAGGTCGTC            | 4080            | 55 |
| CAGTGGGACG TGCCGCTCCA GTCCCCGGTG TCGTGAGCTG GGGAACGACA TCTCCAGCAG            | 4140            | 60 |
|  |                 | 65 |

# DE 197 50 702 A 1

|    |  |                 |
|----|--|-----------------|
|    | ACAGAGGATC TCCCACAGCT GGGAGATTTA GCCGTGTCTG AGGTTGGCTG GGATGGCCTC            | 4200            |
| 5  | AGACTCAACT GGACCGCAGC TGACAATGCC TATGAGCACT TTGTCATTCA GGTGCAGGAG            | 4260            |
|    | GTCAACAAAG TGGAGGCAGC CCAGAACCTC ACGTTGCCTG GCAGCCTCAG GGCTGTGGAC            | 4320            |
| 10 | <del>ATCCCGGGCC TCGAGGCTGC CAGCCCTTAT AGAGTCTCCA TCTATGGGGT GATCCGGGGC</del> | <del>4380</del> |
| 15 | TATAGAACAC CAGTACTCTC TGCTGAGGCC TCCACAGCCA AAGAACCTGA AATTGGAAAC            | 4440            |
|    | TTAAATGTTT CTGACATAAC TCCCGAGAGC TTCAATCTCT CCTGGATGGC TACCGATGGG            | 4500            |
| 20 | ATCTTCGAGA CCTTTACCAT TGAAATTATT GATTCCAATA GGTTGCTGGA GACTGTGGAA            | 4560            |
| 25 | TATAATATCT CTGGTGCTGA ACGAACTGCC CATATCTCAG GGCTACCCCC TAGTACTGAT            | 4620            |
|    | TTTATTGTCT ACCTCTCTGG ACTTGCTCCC AGCATCCGGA CCAAACCAT CAGTGCCACA             | 4680            |
| 30 | GCCACGACAG AGGCCCTGCC CCTTCTGGAA AACCTAACCA TTTCCGACAT TAATCCCTAC            | 4740            |
| 35 | GGGTTACAG TTTCTGGAT GGCATCGGAG AATGCCTTTG ACAGCTTTCT AGTAACGGTG              | 4800            |
|    | GTGGATTCTG GGAAGCTGCT GGACCCCCAG GAATTCACAC TTTCAGGAAC CCAGAGGAAG            | 4860            |
| 40 | CTGGAGCTTA GAGGCCTCAT AACTGGCATT GGCTATGAGG TTATGGTCTC TGGCTTCACC            | 4920            |
| 45 | CAAGGGCATC AAACCAAGCC CTTGAGGGCT GAGATTGTTA CAGAAGCCGA ACCGGAAGTT            | 4980            |
|    | GACAACCTTC TGGTTTCAGA TGCCACCCCA GACGGTTTCC GTCTGTCCTG GACAGCTGAT            | 5040            |
| 50 | GAAGGGGTCT TCGACAATTT TGTCTCAAA ATCAGAGATA CCAAAAAGCA GTCTGAGCCA             | 5100            |
| 55 | CTGGAAATAA CCCTACTTGC CCCCGAACGT ACCAGGGACA TAACAGGTCT CAGAGAGGCT            | 5160            |
| 60 | ACTGAATACG AAATTGAACT CTATGGAATA AGCAAAGGAA GGCGATCCCA GACAGTCAGT            | 5220            |
| 65 |  |                 |

# DE 197 50 702 A 1

|  |                 |    |
|--|-----------------|----|
| GCTATAGCAA CAACAGCCAT GGGCTCCCCA AAGGAAGTCA TTTTCTCAGA CATCACTGAA            | 5280            |    |
| AATTCGGCTA CTGTCAGCTG GAGGGCACCC ACGGCCCAAG TGGAGAGCTT CCGGATTACC            | 5340            | 5  |
| TATGTGCCCCA TTACAGGAGG TACACCCTCC ATGGTAACTG TGGACGGAAC CAAGACTCAG           | 5400            | 10 |
| <del>ACCAGGCTGG TGAAACTCAT ACCTGGCGTG GAGTACCTTG TCAGCATCAT CGCCATGAAG</del> | <del>5460</del> |    |
| GGCTTTGAGG AAAGTGAACC TGTCTCAGGG TCATTCACCA CAGCTCTGGA TGGCCCATCT            | 5520            | 15 |
| GGCCTGGTGA CAGCCAACAT CACTGACTCA GAAGCCTTGG CCAGGTGGCA GCCAGCCATT            | 5580            | 20 |
| GCCACTGTGG ACAGTTATGT CATCTCCTAC ACAGGCGAGA AAGTGCCAGA AATTACACGC            | 5640            |    |
| ACGGTGTCCG GGAACACAGT GGAGTATGCT CTGACCGACC TCGAGCCTGC CACGGAATAC            | 5700            | 25 |
| ACACTGAGAA TCTTTGCAGA GAAAGGGCCC CAGAAGAGCT CAACCATCAC TGCCAAGTTC            | 5760            | 30 |
| ACAACAGACC TCGATTCTCC AAGAGACTTG ACTGCTACTG AGGTTCACTC GGAAACTGCC            | 5820            |    |
| CTCCTTACCT GGCAGCCCCC CCGGGCATCA GTCACCGGTT ACCTGCTGGT CTATGAATCA            | 5880            | 35 |
| GTGGATGGCA CAGTCAAGGA AGTCATTGTG GGTCCAGATA CCACCTCCTA CAGCCTGGCA            | 5940            | 40 |
| GACCTGAGCC CATCCACCCA CTACACAGCC AAGATCCAGG CACTCAATGG GCCCCTGAGG            | 6000            |    |
| AGCAATATGA TCCAGACCAT CTTCAACCACA ATTGGACTCC TGTACCCCTT CCCCAGGAC            | 6060            | 45 |
| TGCTCCCAAG CAATGCTGAA TGGAGACACG ACCTCTGGCC TCTACACCAT TTATCTGAAT            | 6120            | 50 |
| GGTGATAAGG CTCAGGCGCT GGAAGTCTTC TGTGACATGA CCTCTGATGG GGGTGGATGG            | 6180            |    |
| ATTGTGTTCC TGAGACGCAA AAACGGACGC GAGAACTTCT ACCAAAAGTGA GAAGGCATAT           | 6240            | 55 |
| GCTGCTGGAT TTGGGGACCG CAGAGAAGAA TTCTGGCTTG GGCTGGACAA CCTGAACAAA            | 6300            | 60 |
|  |                 | 65 |

|    |  |      |
|----|--|------|
|    | ATCACAGCCC AGGGGCAGTA CGAGCTCCGG GTGGACCTGC GGGACCATGG GGAGACAGCC  | 6360 |
| 5  | TTTGCTGTCT ATGACAAGTT CAGCGTGGGA GATGCCAAGA CTCGCTACAA GCTGAAGGTG  | 6420 |
|    | GAGGGGTACA GTGGGACAGC AGGTGACTCC ATGGCCTACC ACAATGGCAG ATCCTTCTCC  | 6480 |
| 10 | ACCTTTGACA AGGACACAGA TTCAGCCATC ACCAACTGTG CTCTGTCTAC AAGGGGCTTC  | 6540 |
| 15 | TGGTACAGGA ACTGTCACCG TGTCAACCTG ATGGGGAGAT ATGGGGACAA TAACCACAGT  | 6600 |
|    | CAGGGCGTTA ACTGGTTCCA CTGGAAGGGC CACGAACACT CAATCCAGTT TGCTGAGATG  | 6660 |
| 20 | AAGCTGAGAC CAAGCAACTT CAGAAATCTT GAAGGCAGGC GCAAACGGGC ATAAATTGGA  | 6720 |
| 25 | GGGACCACTG GGTGAGAGAG GAATAAGGCG GCCCAGAGCG AGGAAAGGAT TTTACCAAAG  | 6780 |
|    | CATCAATACA ACCAGCCCAA CCATCGGTCC ACACCTGGGC ATTTGGTGAG AATCAAAGCT  | 6840 |
| 30 | GACCATGGAT CCCTGGGGCC AACGGCAACA GCATGGGCCT CACCTCCTCT GTGATTTCTT  | 6900 |
| 35 | TCTTTGCACC AAAGACATCA GTCTCCAACA TGTTCCTGTT TTGTTGTTTG ATTCAGCAAA  | 6960 |
|    | AATCTCCCAG TGACAACATC GCAATAGTTT TTTACTTCTC TTAGGTGGCT CTGGGATGGG  | 7020 |
| 40 | AGAGGGGTAG GATGTACAGG GGTAGTTTGT TTTAGAACCA GCCGTATTTT ACATGAAGCT  | 7080 |
| 45 | GTATAATTAA TTGTCATTAT TTTTGTTAGC AAAGATTAAA TGTGTCATTG GAAGCCATCC  | 7140 |
| 50 | CTTTTTTTTAC ATTTCATACA ACAGAAACCA GAAAAGCAAT ACTGTTTCCA TTTTAAGGAT | 7200 |
|    | ATGATTAATA TTATTAATAT AATAATGATG ATGATGATGA TGAAAATAA GGATTTTCA    | 7260 |
| 55 | AGAGATCTTT CTTTCCAAAA CATTTCTGGA CAGTACCTGA TTGTATTTTT TTTTAAATA   | 7320 |
| 60 | AAAGCACAAG TACTTTTGAA AAAAAA                                       | 7346 |

## Patentansprüche

- 65 1. Oligonukleotid, das an eine Nukleinsäure, die für eine der Isoformen humanen Tenascins oder Teile derselben kodiert, binden kann und das aus maximal 17 Nukleotideinheiten, die gegebenenfalls modifiziert sein können, aufgebaut ist sowie dessen physiologisch verträgliche Salze.
2. Oligonukleotid nach Anspruch 1, welches aus 7 bis 17 Nukleotideinheiten aufgebaut ist.

3. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 und 2, welches aus 11 bis 17 Nukleotideinheiten aufgebaut ist.
4. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, welches an das Tenascin-Gen und/oder Tenascin mRNA und/oder Tenascin cDNA spezifisch binden kann.
5. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, welches spezifisch an eine Nukleinsäure, die die Sequenz in Tabelle 1 oder Teile derselben aufweist, binden kann.
6. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, welches spezifisch an einen Bereich der Nukleinsäure binden kann, der
- a) einen Teil des 5'-nichtkodierenden Bereichs und/oder den Translationsstart oder
  - b) den Translationsstart und/oder einen Teil des kodierenden Bereichs oder
  - c) einen Teil des kodierenden Bereichs und/oder einen Teil des 3'-nichtkodierenden Bereichs
- umfaßt.
7. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, das eine der Sequenzen SEQ ID NO. 2 bis SEQ ID NO. 20 aufweist, wobei SEQ ID NO. 2 bis SEQ ID NO. 20 folgende Bedeutung haben:
- SEQ. ID NO. 2: 3'-GGTTTGGGTGGAGGTGG-5'
- SEQ. ID NO. 3: 3'-GGAGGTGGTACCCCCGG-5'
- SEQ. ID NO. 4: 3'-GGTGGTACCCCCGG-5'
- SEQ. ID NO. 5: 3'-GGAGGTGGTACCCC-5'
- SEQ. ID NO. 6: 3'-AGAAAGAACGAAAGGAA-5'
- SEQ. ID NO. 7: 3'-GGAGGTGGTACC-5'
- SEQ. ID NO. 8: 3'-GGAGCGATGGCTTCCA-5'
- SEQ. ID NO. 9: 3'-AAAGGAACGGGAGCG-5'
- SEQ. ID NO. 10: 3'-GGTCGGTGGGTGG-5'
- SEQ. ID NO. 11: 3'-CTTACAGGTCCGTTGA-5'
- SEQ. ID NO. 12: 3'-GGCCGTGTTCCGCTGT-5'
- SEQ. ID NO. 13: 3'-TCACCCCTCTTTCTGG-5'
- SEQ. ID NO. 14: 3'-GGACACCGACACGG-5'
- SEQ. ID NO. 15: 3'-AACGGGAGCGATGG-5'
- SEQ. ID NO. 16: 3'-ATCTCGGGGTCGTC-5'
- SEQ. ID NO. 17: 3'-AAAGAACGAAAGGAA-5'
- SEQ. ID NO. 18: 3'-GGTGGTACCCC-5'
- SEQ. ID NO. 19: 3'-CCCGGTACTGA-5'
- SEQ. ID NO. 20: 3'-CCACAGAAAGAAC-5'.
8. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, welches eine Sequenz ausgewählt aus der Reihe enthaltend die Sequenzen SEQ ID NO. 2 bis SEQ ID NO. 10 oder SEQ ID NO. 18 hat.
9. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, welches eine der Sequenzen ausgewählt aus der Reihe der Sequenzen SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 7 oder SEQ ID NO. 18 hat.
10. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, das die Sequenz SEQ ID NO. 5 hat.
11. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, das die Sequenz SEQ ID NO. 18 hat.
12. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, welches aus den natürlichen Nukleosiden Adenosin, Guanosin, Inosin, Cytidin, Uridin und Thymidin aufgebaut ist und in welchem die Nukleoside über Phosphorsäurediester Brücken miteinander verknüpft sind.
13. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, welches eine oder mehrere chemische Modifikationen hat.
14. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, welches eine oder mehrere chemische Modifikationen hat, die unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus der Reihe der chemischen Modifikationen a) bis g), wobei
- a) den Ersatz einer Phosphorsäurediester-Brücke durch eine modifizierte Phospho-Brücke,
  - b) den Ersatz einer 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediester-Brücke durch eine "Dephospho"-Brücke,
  - c) den Ersatz einer Zuckerphosphat-Gruppe,
  - d) den Ersatz einer  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheit,
  - e) die Modifikation beziehungsweise den Ersatz einer natürlichen Nucleosid-Base,
  - f) die Konjugation mit einem Molekül, welches die Eigenschaften des Oligonukleotids an eine spezielle Anforderung anpaßt
- und
- g) 3'-3'-Inversion und/oder 5'-5'-Inversion am 3'- beziehungsweise 5'- Ende des Oligonukleotids
- bedeuten.
15. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, welches eine oder mehrere chemische Modifikationen enthält, die unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus der Reihe a) bis g), wobei
- a) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der Phosphorsäurediester-Brücken durch Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-,  $\text{NR}^1$   $\text{R}^1$ -Phosphoramidat-, Boranophosphat-, Phosphat-( $\text{C}_1$ - $\text{C}_{21}$ )-O-Alkylester, Phosphat-[( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{12}$ )Aryl-( $\text{C}_1$ - $\text{C}_{21}$ )-O-Alkyl]ester, ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ )Alkylphosphonat- und/oder ( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{12}$ )-Arylphosphonat-Brücken, wobei  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^1$  unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Reihe enthaltend Wasserstoff, ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_{18}$ )-Alkyl, ( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{20}$ )-Aryl, ( $\text{C}_6$ - $\text{C}_{14}$ )-Aryl-( $\text{C}_1$ - $\text{C}_8$ )-alkyl und/oder  $\text{R}^1$  und  $\text{R}^1$  zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann,

- b) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediester-Brücken durch "Dephospho"-Brücken, wobei die "Dephospho-Brücken" unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus der Reihe enthaltend Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylsulfon und/oder Silylgruppe,
- 5 c) den vollständigen oder teilweisen Ersatz des Zuckerphosphat-Rückgrats, durch "Morpholinonucleosid"-Oligomere und/oder durch Peptid Nucleinsäuren ("PNAs") und/oder Phosphomonosäureester Nukleinsäuren ("PHONAs"),
- 10 d) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheiten, wobei die einzelnen  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheiten unabhängig voneinander ersetzt werden können durch  $\beta$ -D-2'-Desoxyribose, L-2'-Desoxyribose, 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-[O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl]-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose,  $\beta$ -D-Xylofuranose,  $\alpha$ -Arabinofuranose, 2,4-Dideoxy- $\beta$ -D-erythro-hexo-pyranose, carbocyclische und/oder offenkettige Zuckeranaloge und/oder Bicyclo-Zuckeranaloge,
- 15 e) den vollständigen oder teilweisen Ersatz der natürlichen Nucleosid-Basen durch Verbindungen, die unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus der Reihe enthaltend 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkynyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin oder 7-Deaza-7-substituierte Purine,
- 20 f) die Konjugation des Oligonukleotids mit einem oder mehreren Molekülen, welche die Eigenschaften des Oligonukleotids günstig beeinflussen und/oder bei der Hybridisierung des modifizierten Oligonukleotids an die Target-Sequenz diese unter Bindung und/oder Quervernetzung angreift, wobei die Konjugate unabhängig voneinander ausgewählt werden können aus der Reihe enthaltend Poly-Lysin, Interkalatoren, fluoreszierende Verbindungen, Cross-Linker, lipophile Moleküle, Lipide, Steroide, Vitamine, Poly- bzw. Oligoethylenglycol, (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiester und/oder -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-O-(C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Gruppe, und
- 25 g) 3'-3'-Inversionen und/oder 5'-5'-Inversionen am 3'- beziehungsweise 5'-Ende des Oligonukleotids bedeuten.
16. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, wobei das Oligonukleotid mit einem oder mehreren Molekülen ausgewählt aus der Reihe Pyren, Acridin, Phenazin, Phenanthridin, Fluorescein, Psoralen, Azidoproflavin, (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, 1,2-Di-hexadecyl-rac-glycerin, Cholesterin, Testosteron und/oder Vitamin E konjugiert ist.
17. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16, in welchem die Phosphorsäurediester-Brücken teilweise oder vollständig durch Phosphorothioat-Brücken ersetzt sind und welches gegebenenfalls mit einem oder mehreren lipophilen Molekülen, ausgewählt aus der Reihe (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, 1,2-Dihexadecyl-rac-glycerin, (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern und/oder mit -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-O-(C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl, konjugiert ist.
18. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, in welchem alle Phosphodiester-Brücken durch Phosphorothioat-Brücken ersetzt sind (durchgängig modifiziertes Phosphothioat).
19. Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, in welchem ausgewählte Phosphorsäurediester-Brücken durch Phosphothioat-Brücken ersetzt sind (minimal modifiziertes Phosphothioat).
20. Oligonukleotid nach Anspruch 19, welches eine Sequenz ausgewählt aus der Reihe der Sequenzen SEQ ID NO. 21 bis SEQ ID NO. 39 hat, wobei die Sequenzen SEQ ID NO. 21 bis SEQ ID NO. 39 folgende Bedeutung haben:
- 30 SEQ ID NO. 21: 3'-GsGsTsTGGGTsGGAGGsTsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 22: 3'-GsGsAsGGTsGGTsACsCCsCCsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 23: 3'-GsGsTGGTsACsCsCCsCsGsG-5'  
 45 SEQ ID NO. 24: 3'-GsGsAGGTsGGTsACsCsCsC-5'  
 SEQ ID NO. 25: 3'-AsGsAAAGAAcCsGAAAGGsAsA-5'  
 SEQ ID NO. 26: 3'-GsGsAGGTsGGTsAsCsC-5'  
 SEQ ID NO. 27: 3'-GsGsAGCsGATsGGCsTsTsCsA-5'  
 SEQ ID NO. 28: 3'-AsAsAGGAACsGGGAGsCsG-5'  
 50 SEQ ID NO. 29: 3'-GsGsTCGGTsTsTGGGTsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 30: 3'-CsTsTACAGGTsCsCGTsTsGsA-5'  
 SEQ ID NO. 31: 3'-GsGsCsCGsTGTsTCGCsTsGsT-5'  
 SEQ ID NO. 32: 3'-TsCsACsCCsCTsTsTsCsTsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 33: 3'-GsGsAsCACsCGACsACsGsG-5'  
 55 SEQ ID NO. 34: 3'-AsAsCsGGGAGCGATsGsG-5'  
 SEQ ID NO. 35: 3'-AsTsCsTCGGGTsCsGsTsC-5',  
 SEQ ID NO. 36: 3'-AsAsAGAACsGAAAGGsAsA-5'  
 SEQ ID NO. 37: 3'-GsGsTGGTsACsCsCsC-5'  
 SEQ ID NO. 38: 3'-CsCsCsGGTsACsTsGsA-5'  
 60 SEQ ID NO. 39: 3'-CsCsAsCAGAAAGsAsAsC-5'.
21. Chimäres Oligonukleotid nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 17, welches eine "Core Sequenz" und eine oder mehrere flankierende Sequenzen enthält.
22. Chimäres Oligonukleotid nach Anspruch 21, welches eine der Sequenzen ausgewählt aus der Reihe der Sequenzen SEQ ID NO. 40 bis SEQ ID NO. 58 hat, wobei die Sequenzen SEQ ID NO. 40 bis SEQ ID NO. 58 folgende
- 65 Bedeutung haben  
 SEQ ID NO. 40: 3'-GyGyTyTyTyGxGxGxTxGxGxGyGyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 41: 3'-GyGyAyGyGyTxGxGxTxAxCxCxCyCyGyG-5'  
 SEQ ID NO. 42: 3'-GyGyTxGxGxTxAxCxCxCxCyCyGyG-5'



SEQ ID NO. 44: 3'-AyGyAyAxAxGxAxAxCxGxAxAxAyGyGyAyA-5'

SEQ ID NO. 46: 3'-GyGyAxGxCxGxAxTxGyGyCyTyT

SEQ ID NO. 48: 3'-GvGvTvCxGx(GxTxTxTxGxGvGvTvGvG-5'

SEQ ID NO. 49: 3'-CytTtTtAxCxAXGxGXtTxCxCxGyTyTyGyA-  
SEQ ID NO. 50: 3'-Gx(GxCyCxCxTxGxTxTxCxGxCyTv(GyT-5'

SEQ ID NO. 51: 3'-TcCyAycCxCxCxCx1x1x1y1yCy1yGyG-  
SEQ ID NO. 52: 3'-GyGyAycC'x Ax C'x C'x G'x Ax C'x AyC'vG'vG-5'

SEQ ID NO. 53: 3'-AyAyCyGxGxGxAxGxCxGxAyIyGyG-5'  
SEQ ID NO. 54: 3'-AyTyCyTxCxGxGxGxGxTxCxGyTyC-5'

SEQ ID NO. 55: 3'-AyAyAyGxAxAxCxGxAxAxAxGyGyAyA-5'

SEQ ID NO. 57: 3'-CyCxGxGxTxAxCyTyGyA-5'

wobei

webb  
munk

y unabhängig voneinander für 2'-O-Methyl, 2'-O-Propyl, 2'-Methoxyethoxy oder PNA steht.

23. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 22 z

24. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 23 zur Hybridisierung mit

25. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 24 zur Inhibition der Ex-

26. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 25 als Antisense Oligonu-

27. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 26 zur Herstellung eines

28. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 27 zur Herstellung eines

29. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 28 zur Herstellung eines

30. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 28 zur Herstellung eines

31. Verwendung eines Arzneimittels nach Anspruch 30 in Kombination mit Photochemotherapie und/oder der

32. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 27 zur Herstellung eines

33. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 27 zur Herstellung eines

34. Verwendung eines Oligonukleotids nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 27 zur Herstellung eines

35. Verwendung eines Arzneimittels nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 27 zur Behandlung und/oder

36. Arzneimittel enthaltend eines oder mehrere verschiedene Oligonukleotide nach einem oder mehreren der An-

37. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß eine wirksame

stoffen gemischt wird.

Oligonukleotide chemisch an einer Festphase synthetisiert werden.

- Leerseite -

1/2/1

012507970

WPI Acc No: 1999-314075/199927

XRAM Acc No: C99-092955

**Antisense oligonucleotides that bind to sequences encoding human tenascin for treating depigmentation, cancer, inflammation and cardiovascular disease**

Patent Assignee: HOECHST MARION ROUSSEL DEUT GMBH (HMRI ); AVENTIS PHARMA DEUT GMBH (AVET )

Inventor: PEYMAN A; UHLMANN E; WEISER C

Number of Countries: 074 Number of Patents: 004

Basic Patent:

| Patent No   | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|-------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| DE 19750702 | A1   | 19990527 | DE 1050702  | A    | 19971115 | 199927 B |

Priority Applications (No Type Date): DE 1050702 A 19971115

Designated States (National): AL; AU; BA; BB; BG; BR; CA; CN; CU; CZ; EE; GE; HR; HU; ID; IL; IS; JP; KR; LC; LK; LR; LT; LV; MG; MK; MN; MX; NO; NZ; PL; RO; RU; SG; SI; SK; SL; TR; TT; UA; US; UZ; VN; YU

Designated States (Regional): AT; BE; CH; CY; DE; DK; ES; FI; FR; GB; GR; IE; IT; LI; LU; NL; PT; SE; EA; GH; GM; KE; LS; MC; MW; OA; SD; SZ; UG; ZW

Abstract (Basic): DE 19750702 A1

NOVELTY - Oligonucleotides (I) with up to 17 optionally modified nucleotides (nt), or their salts, bind to nucleic acid (II) encoding an isoform of human tenascin (III), or a part of it.

ACTIVITY - Antipsoriasis; antiviteligo; anticancer; anti-inflammatory; cardiovascular.

MECHANISM OF ACTION - Antisense inhibition of (III) expression.

USE - (I) are used to treat or prevent diseases associated with (over)expression of (III), particularly depigmentation (albinism, psoriasis or vitiligo); cancer or metastases, particularly melanoma; inflammation or cardiovascular disease (e.g. restenosis). A preferred application is treatment of vitiligo. (I) may also be used for diagnosis of these diseases.

pp; 17 DwgNo 0/0

Title Terms: BIND; SEQUENCE; ENCODE; HUMAN; TREAT; CANCER; INFLAMMATION; CARDIOVASCULAR; DISEASE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07H-021/04; C12N-015/11

International Patent Class (Additional): A61K-031/70; A61K-048/00; C07H-021/00; C12Q-001/68

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E02F; B04-N06; B12-K04A; B14-C03; B14-F01; B14-H01; B14-N17; D05-H09; D05-H12A

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M781 M905 P420 P520 P522 P633 P943 Q233 RA013I-K RA013I-T RA013I-U

Specific Compound Numbers: RA013I-K; RA013I-T; RA013I-U

Key Word Indexing Terms:

\*01\* 184610-0-0-0-CL, USE

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2001 Derwent Info Ltd. All rights reserved.

© 2001 The Dialog Corporation

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---